

Title	Lysosomal Storage Causes Cellular Dysfunction in Mucopolipidosis II Skin Fibroblasts
Author(s)	大友, 孝信
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58967">https://hdl.handle.net/11094/58967</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	おおとも たかのぶ 大 友 孝 信
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 0 9 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Lysosomal Storage Causes Cellular Dysfunction in Mucopolipidosis II Skin Fibroblasts  (ムコリピドーシスⅡ型の皮膚線維芽細胞ではリソソームに蓄積した物質が様々な細胞機能障害を引き起こしている)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大 藁 恵一  (副査) 教 授 吉 森 保 教 授 谷 池 雅 子

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

ムコリピドーシスⅡ型 (ML-II；別名 I-cell disease) は多発性骨形成不全や精神運動発達遅滞などの臨床症状を呈する常染色体劣性遺伝性の疾患である。リソソーム酵素がリソソームまで運搬されるためには、糖鎖末端のマンノースに対してリン酸化修飾、すなわちマンノース6リン酸 (M6P) 化を受け、M6Pレセプターに認識され、トランスゴルジネットワークを介して運ばれる必要がある。ML-II では小胞体またはゴルジ体に局在する GlcNAc-1-phosphotransferase の遺伝子異常により、リソソーム酵素の糖鎖におけるM6P化が障害されるため、50種類以上あるリソソーム加水分解酵素のリソソームへの運搬が障害される事を病態としている。現時点で根本的な治療法は無く、10歳までに死亡する重篤な疾患である。本疾患のリソソーム内にはあらゆる種類の加水分解酵素が欠損し、分解出来ない様々な種類の基質が蓄積している。我々はML-IIの皮膚線維芽細胞を用い、これらの蓄積が引き起こす細胞表現型を明らかにし、リソソーム酵素補充による治療の可能性を検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

細胞は正常3種類、ML-II3種類の皮膚線維芽細胞を使用した。細胞内の蓄積としてはリン脂質とコレステロールの定量を行い、ML-IIでは正常に比べ2倍程度の蓄積を認めた。lysobisphosphatidic acid (LBPA) の蛍光免疫染色とfilipin染色により、後期エンドソームおよびリソソームにこれらが蓄積している事が示された。リソソームのpHを測定すると、正常細胞では4.79±0.10に対してML-II細胞では5.29±0.08と上昇していた。リソソームのpHを制御していると考えられるプロトンポンプ (V-ATPase) やmucolipin-1のタンパク量はWestern blottingで正常細胞とML-II細胞の間に差が無かったが、正常細胞の培養液にコレステロールを負荷するとリソソームのpHは負荷依存性に上昇したため、リソソームの酸化異常の一因はコレステロールの蓄積により引き起こされている可能性が示された。ML-II細胞では形態学的にリソソームが膨化し数が増えている事が分かっている (inclusion bodyとして観察される) が、これらを定量したところ、1細胞あたりのリソソーム量は正常に比べてML-IIでは3倍程度に増えていた。次にエンドソーム、リソソームにおける蓄積が細胞内輸送に与える影響について検討した。BODIPY-ceramideを培養液中に投与し細胞内輸送を検討すると、正常細胞ではゴルジ体にターゲティングされるのに対してML-II細胞では細胞質のエンドソーム、ライソソームに存在している事が明らかになった。これによりML-IIではエンドサイトリーシスが障害されている事が示された。M6Pレセプター抗体を培養液中に混合し、一定時間細胞表面のM6Pレセプターを標識する事で、その後のM6Pレセ

プター抗体の動きを追跡した。30分から6時間の間抗体を取り込めると、正常細胞では小胞のパターンで存在したが、ML-II細胞ではゴルジ体のパターンを示した。しかし、培養液中の抗体を洗浄し、その後一定時間培養を続けるとML-II細胞におけるゴルジ体に局在するパターンは解消して小胞のパターンとなった。この結果からML-IIにおいてはM6Pレセプターのリサイクリングに遅延が起きている事が示唆された。

続いて、本疾患に対する治療を試みた。ML-IIではM6P化を受けなかった (リソソームまで運搬されない) リソソーム酵素が生体内では体液中 (血漿中)、培養細胞では培養上清中にあふれている。一方で、塩化アンモニウムの様なリソソームインヒビターは正常細胞においてもリソソーム酵素を細胞外に排出させる働きがある事は以前から分かっている。我々は正常皮膚線維芽細胞に塩化アンモニウムを投与し、その培養上清を回収して分子量カラムで精製した。この酵素混合液中の様々なリソソーム酵素活性は、測定した少なくとも10種類の酵素活性において上昇しており、上昇のパターンはML-IIにおける排出のパターンと類似していた。正常から回収した酵素混合液をML-IIに投与すると、細胞内酵素活性は酵素ごとに様々な割合で上昇した。酵素の取り込みが細胞表面のM6Pレセプターを介したものであるかどうかを確認するため、酵素とM6Pを同時に投与しM6Pレセプターを競合阻害すると、M6Pの濃度依存性に酵素の取り込みは阻害された。したがって酵素の取り込みはM6Pレセプターを利用している事が示された。取り込まれたリソソーム酵素はリソソームまで運搬されている事を、蛍光免疫染色において酵素がリソソームのマーカーである Lamp-2と共局在する事で示した。リソソーム酵素補充による効果を、前述の細胞表現型の各項目について検討したところ、基質の蓄積、リソソームのpH、リソソーム数、細胞内輸送の全てにおいて改善を認めた。また、我々は以前にML-IIにおけるオートファジーの異常とミトコンドリアの障害を報告したが、これらも改善を認めた。本疾患に特徴的なinclusion bodyも消失する事を光学顕微鏡および電子顕微鏡により確認した。

### 〔 総 括 〕

これらの結果から、本疾患ではリソソーム酵素の欠損とリソソームに蓄積する様々な基質が様々な細胞機能の障害を引き起こしている事が示唆され、外部からリソソーム酵素を投与する事でML-IIの治療が可能である事を明らかにした。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ムコリピドーシスⅡ型 (別名 I-cell disease) はリソソーム酵素のマンノース6リン酸 (M6P) 化が障害され、リソソーム酵素の運搬異常を病態とする遺伝性の疾患である。現時点で根本的な治療法は無く、10歳までに死亡する重篤な疾患である。

本研究は、本疾患の皮膚線維芽細胞を用いて様々な細胞機能障害、すなわち基質の蓄積、オートファジーの異常、リソソームの酸性化障害、細胞内輸送の障害などを明らかにした。また、正常の皮膚線維芽細胞から得たリソソーム酵素の混合物は、疾患細胞に投与すると細胞表面のM6Pレセプターから取り込まれリソソームまで運搬され、前述の細胞障害の表現型すべてが改善する事を示した。

これらの結果から、本疾患の細胞機能障害の一因が明らかになり、酵素補充治療が可能である事が初めて示された。

以上の成果は、本疾患の病態解明と治療法の開発に通じるもので意義深く、博士 (医学) の学位授与に値すると考えられる。